

段宇, 田永强, 莫钰, 等. 厦门周边水库浮游植物碱性磷酸酶活性研究[J]. 环境科学与技术, 2011, 34(12H):20-24. Duan Yu, Tian Yong-qiang, Mo Yu, et al. A preliminary study of alkaline phosphatase activity of phytoplankton in freshwater lakes around Xiamen[J]. Environmental Science & Technology, 2011, 34(12H): 20-24.

厦门周边水库浮游植物碱性磷酸酶活性研究

段宇, 田永强, 莫钰, 黄邦钦*

(福建省海陆界面生态环境联合重点实验室 厦门大学海洋与环境学院, 福建 厦门 361005)

摘要 从 2010 年 6 月初至 12 月末, 对厦门周边九龙江江水库、厦门大学芙蓉湖和情人湖三个淡水湖库进行两周一次的连续采样, 开展水体总碱性磷酸酶活性(APA)的研究。从营养盐和叶绿素 a 水平看, 三个湖库属不同的富营养化程度: 芙蓉湖 > 情人湖 > 江东南水库。群落水平的总碱性磷酸酶活性和溶解性磷酸盐(SRP)浓度的结果表明, 三处水体均呈现群落水平上的磷胁迫状态, 不同水体的浮游植物群落结构存在显著差异, 同时不同浮游植物的磷胁迫亦不同, 蓝藻是芙蓉湖的绝对优势类群且标记率较低, 绿藻是情人湖和江东南水库的优势类群, 且标记率较高。群落组成在一定程度上可以反映浮游植物群落的磷胁迫状态。

关键词 浮游植物; 碱性磷酸酶活性; 磷胁迫; 淡水湖库

中图分类号: X52 文献标志码: A doi: 10.3969/j.issn.1003-6504.2011.12H.005 文章编号: 1003-6504(2011)12H-0020-05

A Preliminary Study of Alkaline Phosphatase Activity of Phytoplankton in Freshwater Lakes Around Xiamen

DUAN Yu, TIAN Yong-qiang, MO Yu, HUANG Bang-qin*

(Fujian Provincial Joint Key Laboratory of Coastal Ecology and Environmental Studies, College of Oceanography and Environment of science of Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract : Alkaline phosphatase activity (APA) was measured every two weeks during June 2010 to December 2010 in three freshwater lakes around Xiamen: Jiangdong Reservoir of Jiulongjiang River, Furong Lake and Qingren Lake at Xiamen University campus. According to the levels of nutrients and chl a, the three study lakes belong to different eutrophication status with Furong Lake > Qingren Lake > Jiangdong Reservoir. According to the data of bulk APA and soluble reactive phosphorus (SRP) concentration, it showed the status of phosphorus stress in the community level in all three sites. The single-cell ELF-labeling assays showed different structures of phytoplankton community among different sites, low percentages of labeled cells in cyanobacteria, which dominated in Furong Lake, high percentages in chlorophyceae, which dominated in the other two study sites. The community structure could be an indicator of status of phosphorus stress.

Key words : phytoplankton; alkaline phosphatase activity; phosphorus stress; freshwater lakes

浮游植物是水域生态系统的初级生产者, 是整个水生生态系统中物质循环和能量流动的基础。浮游植物的群落结构直接影响着水生生态系统的结构和功能, 同时生态系统中环境因子的改变也直接影响着浮游植物群落结构的变化^[1]。

磷是浮游植物所必需的元素, 但水体中磷的含量通常较低, 因此磷常常是淡水水体生产力的限制性营养元素^[2]。在不同形态的磷源中, 浮游植物唯一能够直

接利用的是无机态的正磷酸盐, 而对于溶解态有机磷, 浮游植物并不能直接吸收利用。碱性磷酸酶是浮游植物普遍存在的一种胞外酶, 当水体中磷酸盐较低时, 碱性磷酸酶被诱导, 将水体中的溶解有机磷转化为溶解无机磷, 为浮游植物生命活动所用^[3]。水体碱性磷酸酶活性与富营养化程度密切相关^[4]。Matavulj 等^[5]对水体 APA 及其它水质参数作了长期、系统的监测, 发现 APA 与浮游细菌、自养和异养细菌数、叶绿素含

《环境科学与技术》编辑部 (网址) <http://fjks.chinajournal.net.cn/> (电话) 027-87643502 (电子信箱) hjkxyjs@126.com

收稿日期: 2011-04-04; 修回: 2011-06-01

基金项目: 厦门市重大科技平台项目(3502Z20091005)

作者简介: 段宇(1983-), 男, 硕士研究生, 研究方向为浮游植物生态学 (电话) 0592-2181151 (电子信箱) duanyu@yahoo.cn; * 通讯作者 (电话) 0592-2187783 (电子信箱) bqhuang@xmu.edu.cn。

量,以及污水生物指数等富营养化指标呈显著的正相关关系,提出 APA 可以用作评价水质的新的生物化学参数;Jones 等^[6]也认为 APA 是量度水生态系统总体营养状况和生物量的适宜指标。水华现象与酶的行为密切相关,在水华频发的法国 Nantua 湖中,夏季磷的缺乏多凭藻类胞外磷酸酶对溶解有机磷的水解而得以补给^[7]。

综上所述,胞外酶在水生态系统的物质循环与能量流动过程中具有重要作用,且极富环境意义。本文通过结合浮游植物群落水平和单细胞水平碱性磷酸酶活性的研究,以亚热带不同富营养程度的三处淡水湖库为研究对象,研究碱性磷酸酶活性与营养盐浓度、浮游植物群落结构之间的关系,旨在探讨浮游植物对富营养化淡水水体生态系统环境条件变化的应对策略及其响应机制,以期为研究淡水水体生态系统物质循环和能量流动提供可参考的科学依据。

1 材料与方法

1.1 站位分布

本文选取江东水库取水口、芙蓉湖和情人湖,共 3 个站位。从 6 月初到 12 月末,平均 2 个星期取 1 次样品。江东水库位于九龙江北溪干流上,是厦门市饮用水的主要来源,水质情况对饮用水安全有着重要意义。芙蓉湖、情人湖均位于厦门大学校内,二者均属封闭型淡水水库,水量主要靠降雨补充。但两个水库的周边环境不同,芙蓉湖面积约为 0.029 23 km²,水深 1~2 m,主要接纳校园雨水和上游水库排水,周围是办公楼和生活区,受人类活动影响较大,水色呈墨绿色,是重度富营养化水体。情人湖水库位于厦门大学后山,面积约为 0.037 85 km²,水深大约为 1~10 m,平均水深 7.5 m,其周围是大片林木,水色呈黄绿色。

1.2 采样方法

使用有机玻璃采水器在水深 0.5 m 处采集水样 1 000 mL,加入 15 mL 鲁格氏剂并摇匀,带回实验室静置沉淀 2 d 后浓缩至 60 mL 供镜检。计数时,充分摇匀浓缩液,然后立即取 0.1 mL 样品放入浮游植物计数框,在光学显微镜下进行鉴定和计数,物镜为 10 或 40 倍,其中部分藻类在油镜下鉴定种类。藻类的分类和计数的主要参考资料为《淡水微型生物图谱》^[8]和《中国淡水藻类:系统分类及生态》^[9]。

1.3 营养盐的测定方法

水样使用碱性过硫酸钾消解-紫外分光光度法(GB/T11894-1989)测定总氮(TN);使用钼酸胺分光光度法(GB/T11893-1989)测定总磷(TP);使用磷钼蓝分光光度法(GB17378.4/39.1-2007)测定溶解性磷

酸盐(SRP),方法参考国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》(第四版)^[10]pH、DO、水温、透明度等参数,采样时现场测定并记录。营养盐样品由厦门市环境监测中心站测定。

1.4 叶绿素 a 的测定方法

叶绿素 a 浓度的测定参照 Parsons(1984)等描述的方法^[11],水样使用 25 mm GF/F 滤膜(Whatman)在不低于 40 mm Hg 的负压下进行抽滤,过滤体积为 50~100 mL,在过滤结束前加过饱和碱式碳酸镁溶液两滴,将滤膜取下于 -20 ℃保存,在 24 h 内使用荧光分光光度计进行测定,激发和发射波长分别设置为 430 nm 和 670 nm,测定荧光值,计算得到叶绿素 a 浓度。

1.5 群落水平的碱性磷酸酶活性的测定

参考 Hoppe 的测定方法^[12],加入 MUP(4-Methylumbelliferyl phosphate)为反应底物,37 ℃恒温避光培养 1 h,用 8 mmol/L 的 HgCl₂ 溶液终止酶反应;空白对照水样暂不加 MUP,与样品同样操作步骤,加入 HgCl₂ 溶液终止酶反应,再加入等量的 MUP。所有样品 -20 ℃保存待测。采用荧光分光光度计(Varian Cary eclipse,)激发和发射波长分别设置为 365 nm 和 450 nm,测定荧光值,计算碱性磷酸酶活性。

1.6 ELF 检测单细胞水平碱性磷酸酶活力方法

该方法主要参照 González-Gil 等^[13]的方法并进行了改进。用 10 μm 筛绢收集藻液,加入 100 μL 70% 酒精,4 ℃冰箱中培养 30 min,然后使用 4 000 r/min 离心 4 min,弃上清液。采用 ELF-97TM (Molecular probes Inc.,OR) 作为荧光标记底物,4 ℃避光培养 1 h,离心去上清液,重复操作两次,然后将藻液保持在 4 ℃环境中。ELF 与酶反应可产生荧光沉淀附着于酶位点上,在紫外波段下可发黄绿色荧光,使用荧光倒置显微镜(Leica)镜检浮游植物的荧光标记情况。

1.7 数据分析处理

在进行数据分析时,采用线性回归分析 APA 与各环境因子的相关性。所有数据检验均在 SPSS16.0 下完成。

2 实验结果

2.1 营养盐和叶绿素 a 浓度

本论文实验从 2010 年 6 月初开展,到 12 月末结束。水体温度范围是 14.7~30.4 ℃,最高温出现在 8 月 11 日,最低温出现在 12 月 29 日,平均温度为 24.6 ℃;芙蓉湖的总氮浓度为 2.94~7.58 mg/L,平均值为 4.49 mg/L,总磷浓度为 0.07~0.25 mg/L,平均值为 0.14 mg/L;情人湖总氮浓度为 1.91~3.70 mg/L,平均值为 2.80 mg/L,总磷浓度为 0.05~0.15 mg/L,平均值

为 0.09 mg/L, 江东水库总氮浓度为 1.93~3.23 mg/L, 平均值为 2.48 mg/L, 总磷浓度为 0.02~0.09 mg/L, 平均值为 0.05 mg/L (图 1a、b)。总氮总磷的浓度, 芙蓉湖>情人湖>江东水库。溶解性磷酸盐(SRP)浓度在三处水体之间无明显差异, 但每个水体中变化幅度较大 (图 1c)。

芙蓉湖最高叶绿素 a 浓度可达 230.1 $\mu\text{g/L}$, 整个调查期间都高于 50 $\mu\text{g/L}$, 平均 125.9 $\mu\text{g/L}$, 属于重度富营养化水体; 情人湖平均 39.4 $\mu\text{g/L}$; 江东水库最

低, 平均 5.0 $\mu\text{g/L}$, 可见叶绿素 a 浓度在三个调查水体间呈现明显差异 (图 1d)。

叶绿素 a 浓度的分布还存在明显的季节变化, 叶绿素 a 高值出现在温度和光照都较适宜的夏季, 进入秋季和冬季后, 叶绿素 a 浓度则出现相对较低值, 其中季节差异最为显著的是芙蓉湖, 最高值和最低值之间相差 4 倍以上; 情人湖的变化趋势与芙蓉湖相似; 江东水库的季节差异较小, 仅在夏季的某些调查时间点出现相对高值。

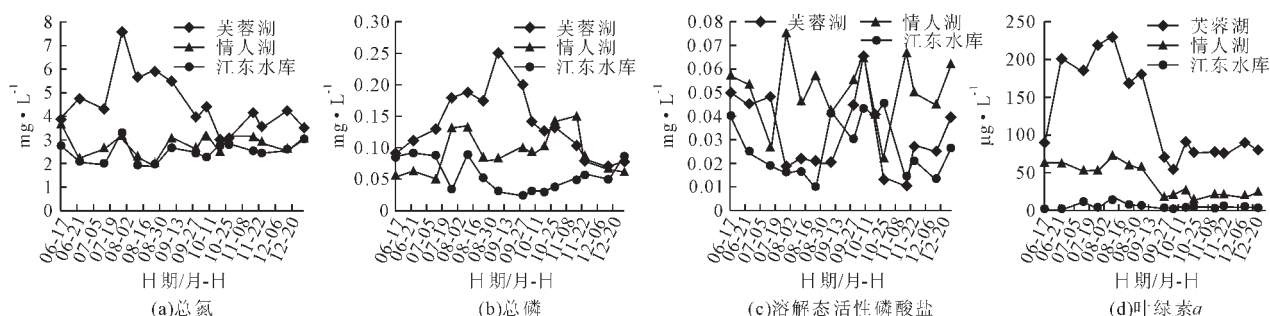


图1 三处淡水湖库水体化学和生物参数分布图

2.2 群落水平的碱性磷酸酶活性

群落水平的碱性磷酸酶活性, 反映的是水体中总的碱性磷酸酶活性, 含游离态和颗粒态。芙蓉湖的 APA 值为 1 451~8 132 nmol/(L·h), 均值为 3 334 nmol/(L·h); 情人湖的 APA 值为 531~2359 nmol/(L·h), 均值为 1 284 nmol/(L·h); 九龙江 APA 值为 99~372 nmol/(L·h), 均值为 236 nmol/(L·h)。从图 2 可以看出, 芙蓉湖的 APA 值高于情人湖, 而江东水库的 APA 值最低, 这与三个水体的生物量大小之间有较好的一致性。芙蓉湖的 Bulk APA 的峰值出现在 9 月 8 日, 从 6 月初的 1 902 nmol/(L·h), 呈现上升趋势到 8 133 nmol/(L·h), 与同期叶绿素 a 浓度保持相对稳定的情况并不一致, 9 月 29 日相对于 9 月 8 日, 叶绿素 a 浓度出现明显下降, Bulk APA 也随之出现明显的下降; 之后在 10 月 27 日和 11 月 17 日略有回升外, 总体呈下降趋势。情人湖的 Bulk APA 除了在 9 月 8 日未出现峰值外, 其余的趋势与芙蓉湖相似, 但数值上仅为后者的一半左右。江东水库的 Bulk APA 在调查期间保持相对稳定的状态, 并未出现明显的峰值。

2.3 单细胞碱性磷酸酶活性

浮游植物群落多样性, 芙蓉湖最低, 常见种类仅 20 余种, 其中蓝藻门占绝对优势, 丰度可达 90% 以上, 优势种为微小平列藻 (*Oscillatoria tenuissima*) 和假鱼腥藻 (*Pseudanabaena* sp.) 等; 情人湖的种类达 30 多种, 以绿藻门占优势, 蓝藻门和硅藻门的种类较少, 主要为绿藻门的四尾栅藻 (*Scenedesmus quadricauda*) 和四角十字藻 (*Crucigenia quadrata*), 蓝藻门的微小平

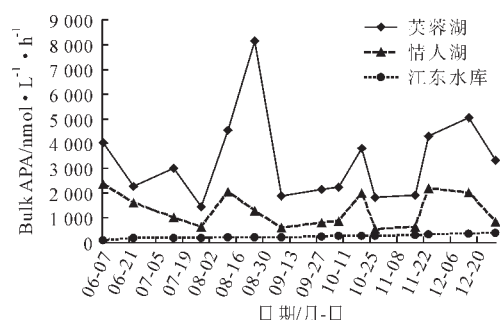


图2 三处淡水湖库群落水平碱性磷酸酶活性分布图

列藻, 硅藻门的颗粒直链藻 (*Melosira granulata*); 江东水库的浮游植物多样性最丰富, 可鉴定的种类达到 80 多种, 其中绿藻门最多, 主要为四尾栅藻和二角盘星藻 (*Pediastrum duplex*), 其次是硅藻门, 主要为颗粒直链藻和肘状针杆藻 (*Synedra ulna*), 蓝藻只在 7、8 月份的某些时间点有较高的丰度, 并观察到了少量的甲藻和隐藻, 它们在夏季时丰度较低, 到秋冬季则开始增加。

三个湖库主要种类 (优势种) 单细胞碱性磷酸酶活性 ELF 标记结果 (图 3)。蓝藻和硅藻的标记率都较低, 蓝藻的平均标记率仅 2%, 硅藻也都低于 10%。绿藻的标记率都较高, 其中四尾栅藻在三个湖库中均存在, 标记率相近, 但存在不同的季节变化特征, 情人湖和芙蓉湖的标记率高值分别出现在 9、10 月, 江东水库则出现在夏季的 7、8 月, 其它种类的绿藻也存在相似的规律。

3 讨论

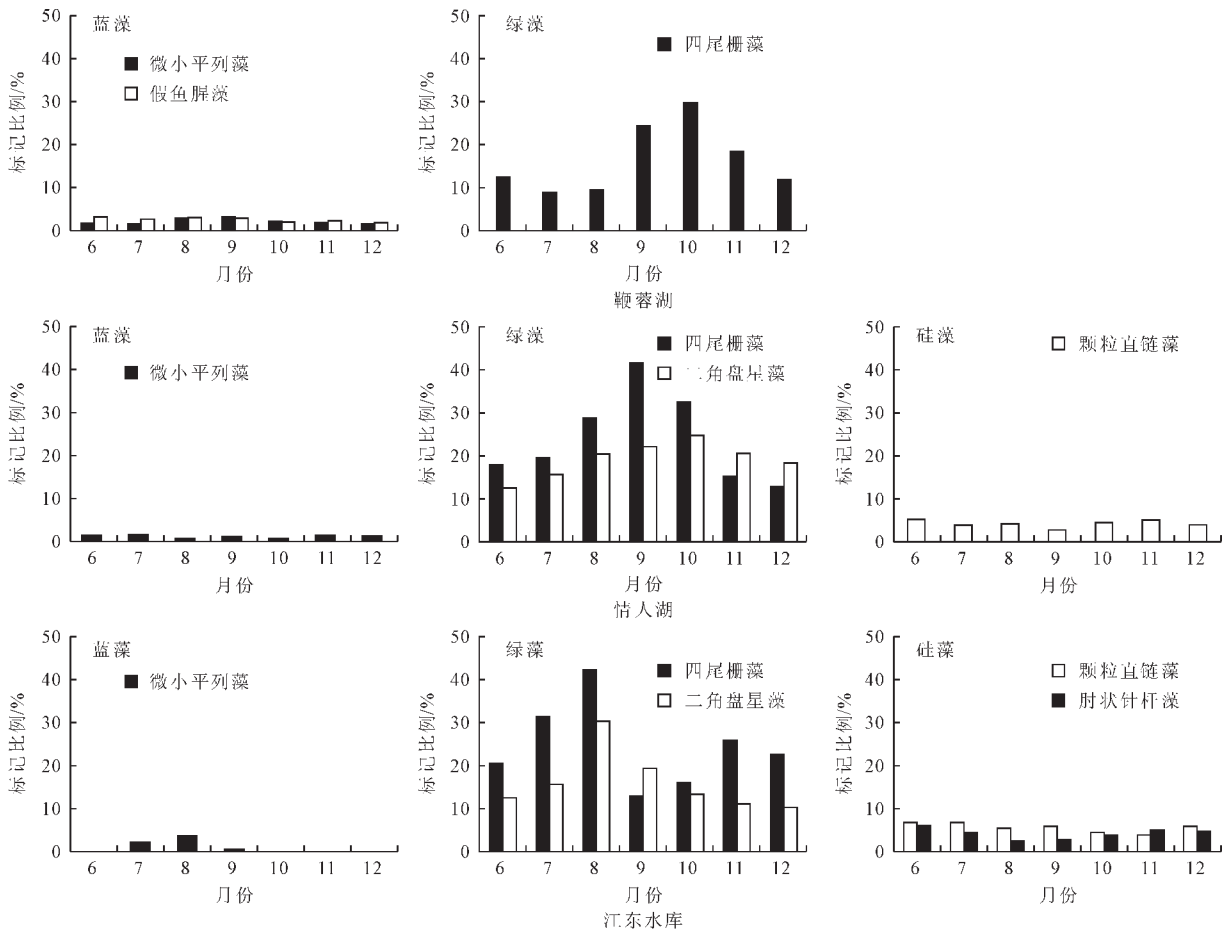


图3 三处淡水湖库主要浮游植物种类单细胞碱性磷酸酶活性 (single-cell APA) 分布

氮和磷是浮游植物生长所需的主要营养元素,从实验结果看,总氮和总磷均与叶绿素 a 浓度有较好的正相关性($P<0.01$ t -test),生物量的高低主要受氮、磷营养盐浓度的调控。根据经济合作与发展组织 (OECD)提出的标准^[14],从营养盐上看,这三个湖库都属于富营养水体,只是富营养化程度不同。低浓度 SRP 可诱导碱性磷酸酶的表达,碱性磷酸酶活性的高低能在一定程度上反映浮游植物的磷胁迫状态。在本次实验结果中,SRP 与 Bulk APA 之间并无显著相关 ($P>0.05$ t -test),可能与 SRP 浓度较低,但一直处于较快的循环利用状态中有关^[15]。Bulk APA 的表达量与总氮和总磷的浓度呈显著正相关 ($P<0.05$ t -test)。但 Bulk APA 反映的是一种整体的状态,与总生物量的大小有关,不能表现单个细胞的磷胁迫状态和区分不同藻种间的胁迫程度。

单细胞碱性磷酸酶活性,可从 ELF 标记率情况得出。三处水体的浮游植物群落结构和多样性差异较大,其中蓝藻的 ELF 标记率均低,仅 2%左右,蓝藻为芙蓉湖的优势类群,镜检中同时可观察到大量游离荧光亮点,结合分粒级 Bulk APA 实验的结果,表明细菌可能是芙蓉湖 Bulk APA 的主要贡献者,浮游植物群落的贡献度较低,另外在出现叶绿素 a 高值的夏季,

四尾栅藻的 ELF 标记率也是调查期间最低,说明生物产生的碱性磷酸酶促进了水体中有机磷向无机磷的转变,加速了磷循环,为蓝藻的暴发提供了有利条件,并在某种程度上减轻了其它藻类如绿藻的磷胁迫状态。绿藻在情人湖和江东水库都是优势类群,ELF 标记率都较高,说明两处水体群落整体的磷胁迫程度较高,同时将 Bulk APA 除以叶绿素 a 浓度,江东水库要高于情人湖,说明江东水库的磷胁迫程度更高。此外,甲藻仅在江东水库中发现,虽然丰度较低,但标记率最高可达 75%。碱性磷酸酶的表达在浮游植物群落内呈现多样化,不同种类的浮游植物的标记情况不同;同一种类的浮游植物,在相同环境中被标记的情况也有不同,有的产生标记,有的无标记,有的大面积被标记,有的只有少量荧光小点,这些结果说明,不同浮游植物种类甚至同种不同个体间存在不同的磷需求或者磷营养利用策略^[16]。

4 结语

通过结合群落水平和单细胞水平碱性磷酸酶活性的研究方法,针对亚热带富营养化程度不同的三处淡水湖库,研究碱性磷酸酶活性与环境营养盐浓度、浮游植物群落结构之间的关系。结果显示,低

SRP 浓度诱导碱性磷酸酶的表达,浮游植物群落处于磷胁迫状态。ELF 标记实验的结果,发现碱性磷酸酶的表达在浮游植物不同种类甚至同种不同个体之间存在较大差异,体现了不同浮游植物种类可能存在不同的磷利用策略。在不同营养状态的水体间,浮游植物群落结构存在较大差异,不同胁迫状态种类的组合在一定程度上决定了群落整体的胁迫状态,反之,物种自身的磷利用策略也可能决定了其在竞争中的优劣程度,最终决定浮游植物的群落结构。

[参考文献]

- [1] W G Lund. The ecology of freshwater phytoplankton [J]. *Biological Reviews*.1965, 40: 231-290.
 - [2] D L Correll. Role of phosphorus in the eutrophication of receiving waters: A Review[J]. *Journal of Environmental Quality*, 1998, 27: 261-266.
 - [3] K Björkman, D M Karl. Bioavailability of inorganic and organic phosphorus compounds to natural assemblages of microorganisms in Hawaiian coastal waters[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1994, 11(1): 265-273.
 - [4] W Reichardt, J Overbeck, L Steubing. Free dissolved enzymes in lake waters[J]. *Nature*, 1967, 216: 1345-1347.
 - [5] J M Yelloly, B A Whitton. Seasonal changes in ambient phosphate and phosphatase activities of the cyanobacterium *Rivularia atra* in intertidal pools at Tyne Sands[M]. *Scotland Hydrobiologia*, 1996, 325: 201-212.
 - [6] G Jones. Studies on freshwater bacteria: Association with algae and alkaline phosphatase activity[J]. *Ecology*, 1972, 60: 59-75.
 - [7] M Matavulj, S Gajin, M Gantar. Phosphatase activity as an additional parameter of water condition estimate in some lakes of Vojvodina Province[J]. *ACTA BIOL.INGOSL*, 1984, 21: 53-62.
 - [8] 周凤霞, 陈剑虹. 淡水微生物图谱[M]. 第一版. 北京: 化学工业出版社, 2010.
Zhou Feng-xia, Chen Jian-hong. *Collection of Freshwater Microbial*[M]. First edition. Beijing: Chemical Industry Press, 2010. (in Chinese)
 - [9] 胡鸿钧. 中国淡水藻类: 系统分类及生态[M]. 第一版. 北京: 科学出版社, 2006.
Hu Hong-jun. *The Freshwater Algae of China: Systematics, Taxonomy and Ecology*[M]. First edition. Beijing: Science Press, 2010. (in Chinese)
 - [10] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法 [M]. 第四版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
State Environmental Protection Administration, Water and Wastewater Monitoring Method[M]. Fourth edition. Beijing: China Environmental Science Press, 2002. (in Chinese)
 - [11] T R Parsons, Y Maita, C M Lalli. A manual of chemical and biological methods for seawater analysis[J]. Pergamon Press, 1984, 78-83.
 - [12] H G Hoppe. Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl-substrates [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1983, 11: 299-308.
 - [13] S González-Gil, B A Keafer, R V M Jovine. Detection and quantification of alkaline phosphatase in single cells of phosphorus-starved marine phytoplankton[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1998, 164: 21-35.
 - [14] 世界经济合作与发展组织(OECD)水体富营养化监测评价与防治[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1989: 92-95.
Eutrophication of Waters: Monitoring, Assessment. Organization for Economic Cooperation and Development(OECD) [M]. Beijing: China Environmental Science Press, 1989: 92-95. (in Chinese)
 - [15] H Li, M J W Veldhuis, A F Post. Alkaline phosphatase activities among planktonic communities in the northern Red Sea[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 1998, 173: 107-115.
 - [16] K Rengefors, K Pettersson, T Blenckner. Species-specific alkaline phosphatase activity in freshwater spring phytoplankton: Application of a novel method[J]. *Journal of Plankton Research*, 2001, 23: 435-443.
- 致谢: 本文的营养盐数据由厦门市环境监测中心站提供, 特此致谢!

(上接第 6 页)

- [28] 王开发, 支崇远, 陶明华. 厦门附近潮滩表层沉积剖面硅藻组合研究[J]. *海洋通报*, 2003, 22(5): 15-19.
Wang Kai-fa, Zhi Chong-yuan, Tao Ming-hua. Study on diatom assemblage in surface sediment profile of tidal beach near Xiamen[J]. *Marine Science Bulletin*, 2003, 22(5): 15-19. (in Chinese)
- [29] 杨清良, 林更铭. 厦门海域浮游植物夏季赤潮期间分布变异的多元分析[J]. *生态学报*, 2007, 27(2): 465-476.
Yang Qing-liang, Lin Geng-ming. A multivariate analysis

of variability of phytoplankton distribution in Xiamen seas during summer bloom period[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(2): 465-476. (in Chinese)

- [30] 黄文盛. 长江口粘土矿物的电镜观察和化学特征[J]. *海洋地质与第四纪地质*, 1985, 5(3): 57-69.
Huang Wen-sheng. TEM, SEM identification of clay minerals and their chemical composition character in Yangtze River Estuary[J]. *Marine Geology and Quaternary Geology*, 1985, 5(3): 57-69. (in Chinese)